



①9 **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 40 545 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 12 Q 1/37

②① Aktenzeichen: 198 40 545.6
②② Anmeldetag: 28. 8. 1998
④③ Offenlegungstag: 9. 3. 2000

DE 198 40 545 A 1

⑦① Anmelder:
Jerini BioTools GmbH, 12489 Berlin, DE

⑦② Erfinder:
Reineke, Ulrich, 10249 Berlin, DE; Germeroth,
Lothar, 10717 Berlin, DE; Schneider-Mergener,
Jens, 10717 Berlin, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

EP	04 28 000 A1
WO	96 13 607 A1
WO	94 28 166 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Festphasengebundene Peptide mit intramolekularem Fluoreszenz-Energie-Transfer zur Identifizierung von Substraten und Inhibitoren von Proteasen

⑤⑦ Die Erfindung beschreibt in erster Linie ein Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung von Protease-substraten und Inhibitoren. Dabei werden Proteasesubstrate und Inhibitoren oder Substanzen, die auf entsprechende Eigenschaften getestet werden sollen, auf kontinuierlichen festen Trägern synthetisiert und auf diesen Trägern getestet. Die enzymatische Zugänglichkeit ist dabei von entscheidender Bedeutung und wird durch erfindungsgemäße polymere Träger gewährleistet. Zum Nachweis von Proteaseaktivität an entsprechenden Substraten und unter Einfluß von Inhibitoren wird ein internes Fluoreszenz-Donor-Akzeptor-Paar verwendet. Die erfindungsgemäßen Verfahren können auch zur Routinediagnostik und zu Untersuchungen an Esterasen und zuckerabbauenden Enzymen verwendet werden.

DE 198 40 545 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung und routinemäßigen Anwendung von Proteasesubstraten und Proteaseinhibitoren unter Verwendung von kontinuierlichen planaren Oberflächen als Syntheseorte.

Stand der Technik

Für die Untersuchung von Protease- und Peptidaspezifitäten wurden folgende Lösungen erarbeitet:

- (i) Substratspezifitäten von Proteasen und Peptidasen werden mit Hilfe löslicher Substrate untersucht [SCHELLENBERGER et al. (1991) Eur. J. Biochem., Vol. 199, pp 623–636]. Die Substrate enthalten Aminosäuren, deren Einfluß auf die Eignung als Substrat bestimmt werden soll. Die Enzymreaktion wird entweder mittels HPLC oder mit chromogenen Substraten, die die Absorption bei Spaltung ändern, verfolgt. Das Verfahren ist experimentell aufwendig und der Durchsatz an zu testenden Substraten ist gering.
- (ii) Eine andere Methode besteht darin, intern gequenchte fluorogene Substrate in Lösung zu verwenden [YARON et al. (1979) Anal. Biochem., Vol. 95, pp 228–235]. An den entgegengesetzten Termini des Substrates werden ein Fluoreszenzdonor und ein Fluoreszenzakzeptor eines geeigneten Paares synthetisiert. Im kompletten Substrat wird die Fluoreszenzemission des Donors mehr oder weniger vollständig vom Akzeptor absorbiert. Bei Spaltung des Substrates werden Donor und Akzeptor räumlich getrennt und das Quenching wird aufgehoben. Verschiedene Donor-Akzeptor-Paare wurden beschrieben [JULIANO et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 173, pp 647–652; WANG and KRAFFT (1992) Bioorg. Biomed. Chem. Lett., Vol. 2, pp 1665–1668; MELDAL and BREDAM (1991) Anal. Biochem., Vol. 195, pp 141–147]. Wie die unter (i) beschriebene Methode ist auch hier nur ein begrenzter Durchsatz an zu testenden Substanzen experimentell durchführbar.
- (iii) Es wurde ein Assaysystem mit festphasengebunden intern gequenchten Substraten beschrieben [MELDAL (1998) Meth. Mol. Biol., Vol. 87, pp 51–57; MELDAL et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, pp 3314–3318]. Die Substrate enthalten das Donor-Akzeptor-Paar Anthranilsäure/Nitrotyrosin. Die Substrate werden auf Syntheseharzkügelchen aus Polyethylenglykol Polyamid Kopolymeren (PEGA) synthetisiert. Mit diesem Verfahren können sowohl wenige definierte Substrate als auch große kombinatorische Bibliotheken untersucht werden. Die kombinatorischen Substratbibliotheken werden nach der "divide, couple and recombine" Methode [MELDAL (1998) Meth. Mol. Biol., Vol. 87, pp 51–57; MELDAL et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, pp 3314–3318] hergestellt. Jede Harzkugel dieser Bibliotheken enthält nur Peptide einer bestimmten Sequenz. Alle Harzkugeln zusammen werden der entsprechenden Proteaseaktivität ausgesetzt. Einzelne Kugeln werden z. B. unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewählt und die Substrate werden durch Sequenzierung bestimmt. Mit dieser Methode können sehr viele verschiedene Substrate gleichzeitig untersucht werden. Der Nachteil der Methode ist ein aufwendiges Sequenzierungsverfahren, das nur an einem Bruchteil der Harzkügelchen durchgeführt werden kann. Eine systematische Untersuchung von z. B. 200 Substratanaloga mit allen mög-

lichen Punktsubstitutionen ist mit dieser Methode nicht möglich.

(iv) Weiterhin wurde ein Verfahren beschrieben, bei dem Proteasesubstrate, die auf modifizierten Polypropylen-Scheiben synthetisiert wurden, Verwendung finden [DUAN and LAURSEN (1994) Anal. Biochem., Vol. 216, pp 431–438]. Die Substrate enthalten am N-Terminus das Fluorophor Fluoresceinylthiocarbamat, das nicht intern gequench wird. Die Polypropylen-Scheiben mit den Substraten werden mit einer Vorrichtung in Mikrotiterplatten mit Proteaselösung gehängt. Das Fluorophor mit dem N-terminalen Teil des Peptids wird abgespalten und kann mit einem Fluoreszenzlesegerät nach dem Entfernen der Polypropylen-Scheiben mit der Vorrichtung quantifiziert werden. Nachteile dieser Methode sind das arbeitsaufwendige Befestigen der Polypropylen-Scheiben an der Halterungsvorrichtung und das Problem, daß das Fluorophor in die Proteaselösung freigesetzt wird. Beimischungen in unge reinigten Proteaselösungen können die Messung beeinträchtigen.

(v) Die unter (iii) beschriebene Methode wird mit Peptiden durchgeführt, die mittels Spotsynthese [FRANK et al. (1992) Tetrahedron, Vol. 48, pp 9217–9232] auf kontinuierlichen Celluloseträgern synthetisiert und getestet werden. Entsprechende Assaysysteme werden von der Firma Jerini Bio Tools kommerziell angeboten. Nachteil dieser Methode ist, das Peptide an Orten der Cellulose synthetisiert werden, die zwar für die Reagenzien aber nicht für große Proteasemoleküle zugänglich sind. Selbst optimale Substrate werden in diesen Testsystemen nur zu etwa 20 bis 30% gespalten.

(vi) Klassisch werden Proteaseinhibitoren in Lösung identifiziert. Zu einer optimierten Mischung aus Protease und Substrat wird die zu testende inhibitorische Substanz zugegeben, deren Wirkung auf den Verlauf der Substratumsetzung gemessen wird.

(vii) Es wurde ein festphasengebundener bibliotheksbasierter Assay zur Identifizierung von Enzyminhibitoren beschrieben [MELDAL (1998) Meth. Mol. Biol., Vol. 87, pp 25–39]. Bei diesem Verfahren werden die Syntheseorte auf PEGA Harzkügelchen zu einem Drittel mit einem geeigneten Substrat und zu zwei Dritteln mit einer zu testenden inhibitorischen Substanz belegt. Bei entsprechender inhibitorischer Wirkung wird das Substrat auf dem Harzkügelchen nicht umgesetzt. Nachteilig ist wie bei (iii), das die Inhibitorsequenz nur durch aufwendige Sequenzierungsverfahren bestimmt werden kann.

Aufgabe und Lösung (Identifizierung von Proteasesubstraten)

Es stellt sich die Aufgabe, ein Testsystem herzustellen, mit dem viele verschiedene potentielle Proteasesubstrate systematisch in einem schnell und unkompliziert auszuwertendem Verfahren getestet werden können.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Substraten, die

- a) auf polymeren kontinuierlichen Oberflächen anders als Cellulose (z. B. mikroporöse Polypropylen Membranen modifiziert durch photoinitierte Graft-Kopolymerisation mit Poly-Ethylenglykol Methacrylsäure), die eine Zugänglichkeit eines hohen Prozentsatzes der Substrate für die Proteasen gewährleisten, synthetisiert und getestet werden,

b) ein intern gequenchtes Fluoreszenz Donor-Akzeptor-Paar zur Verfolgung der Proteaseaktivität besitzen.

Umfassend die folgenden Schritte:

- Herstellen der zu untersuchenden Proteasesubstrate,
- wobei die zu untersuchende Sequenz von einem Fluoreszenz Donor-Akzeptor-Paar eingerahmt wird und sich der Donor zwischen polymerem Träger und zu untersuchender Sequenz befindet,
- Zugabe einer Lösung, die Proteaseaktivität enthält, und Abwarten einer Reaktionszeit,
- Abwaschen der Proteaselösung und der abgespaltenen Peptidfragmente,
- Messung der Zunahme der Fluoreszenz und
- Identifizieren der Substratsequenz durch Bestimmung des Ortes auf dem kontinuierlichen Träger.

Vorteile

Die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens bestehen in den folgenden Punkten:

- Mit Hilfe der Spotsynthesetechnik [R. FRANK (1992) Tetrahedron, Vol. 48, pp 9217–9232] sind große Anzahlen von Substraten auf kontinuierlichen polymeren Oberflächen schnell und mit geringem Arbeitsaufwand automatisiert herstellbar (8000 bis 10000 Peptide oder Peptidgemische auf einer Fläche von 20 mal 30 cm).
- Ein Testsystem, das festphasengebundene Substrate verwendet, hat gegenüber löslichen Substraten den Vorteil, daß die Lösung mit der Proteaseaktivität und den abgespaltenen Substratfragmenten durch einfache Waschschritte entfernt werden kann, was die Sensitivität erhöht. Außerdem können ungereinigte Proteaselösungen mit Beimengungen, die einen Assay in Lösung stören würden, verwendet werden.
- Gegenüber anderen Proteaseassays mit fluoreszenzgequenchten oder anderen Substraten besteht der Vorteil, die Substrate ortsadressiert synthetisiert werden. Dadurch kann die Sequenz eines guten Substrates sofort mit Hilfe der Sequenzliste und des Koordinatenfiles bestimmt werden, ohne eine aufwendige Sequenzierung durchzuführen. Besonders Substitutionsanalysen von Substratsequenzen, in denen systematisch alle möglichen Punktsubstitutionen der Ausgangssequenz synthetisiert werden, sind mit dem erfindungsgemäßen Verfahren einfach und schnell durchführbar.
- Intern fluoreszenzgequenchte Peptide haben gegenüber dem unter (iv) beschriebenen Verfahren den Vorteil, daß die Messung auf der kontinuierlichen Oberfläche stattfindet. Die Handhabung vieler einzelner Polypropylen-Scheiben ist wesentlich arbeitsaufwendiger und fehleranfälliger. Die unter (iv) beschriebene Methode hat außerdem den Nachteil, daß das Fluorophor in die Proteaselösung freigesetzt wird, und so keine absorbierenden oder verunreinigten Proteaselösungen verwendet werden können.
- Gegenüber dem unter (v) beschriebenen Verfahren haben mikroporöse Polypropylen Membranen modifiziert durch photoinitierte Graft-Kopolymerisation mit Poly-Ethylenglykol Methacrylsäure den Vorteil, daß ein wesentlich höherer Prozentsatz der Substratmoleküle auch für Proteine (Enzyme) zugänglich ist (siehe Beispiel). Das erhöht die Sensitivität des Nachweissystems.

Anwendungen

- Es können Substrate für Proteasen de novo und aus den Sequenzen von Proteinen, die gespalten werden, identifiziert werden. Bereits bekannte Substrate können z. B. durch Substitutionsanalysen optimiert werden.
- Andererseits gibt es Anwendungen, in denen Proteasestabilität von bestimmten Sequenzen gefordert ist. Entsprechende Sequenzen können ebenfalls mit dem erfindungsgemäßen Verfahren identifiziert werden.
- In vielen biotechnologischen Produktionsprozessen werden Proteasen eingesetzt (z. B. Peptonherstellung). Es gibt Anwendungen, in denen die Proteaseaktivität im Anschluß an den Produktionsprozeß inaktiviert wird (z. B. Hitzeeinaktivierung). Zur Verlaufskontrolle der Inaktivierung ist ein schnelles und einfaches Testsystem notwendig, das durch das erfindungsgemäße Verfahren bereitgestellt werden kann.
- Proteasen spielen bei vielen physiologischen und pathologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Diese Proteasen sind diagnostischen Tests häufig schwer zugänglich. Bekannte Substrate können in intern fluoreszenzgequenchter Form zur Routinediagnostik eingesetzt werden.
- Desweiteren können entsprechende Festphasen gebundene Proteasesubstrate in der in vivo Diagnostik eingesetzt werden, indem die festen Träger in den Körper implantiert oder geschluckt werden. Nach der Ausscheidung oder Explantation der Träger werden sie zur Diagnose ausgewertet.
- Erfindungsgemäße polymere Träger sind für viele Anwendungen bevorzugt geeignet, da sie biologisch nicht abbaubar sind. Viele Präparationen von Proteasen enthalten neben der Proteaseaktivität noch weitere Enzymaktivitäten. Besonders Cellulasen können einen Einsatz von cellulosegebunden Molekülen unmöglich machen. Die Stabilität des Trägers gegenüber biologischem Abbau ist weiterhin ein großer Vorteil für die in vivo Diagnostik.

Aufgabe und Lösung (Identifizierung von Proteaseinhibitoren)

Es stellt sich die Aufgabe, ein Testsystem herzustellen, mit dem viele verschiedene potentielle Proteaseinhibitoren systematisch in einem schnell und unkompliziert auszuwertendem Verfahren getestet werden können.

(I) Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Inhibitoren, die

- a) auf polymeren kontinuierlichen Oberflächen anders als Cellulose (z. B. mikroporöse Polypropylen Membranen modifiziert durch photoinitierte Graft-Kopolymerisation mit Poly-Ethylenglykol Methacrylsäure), die eine Zugänglichkeit eines hohen Prozentsatzes der Substrate und Inhibitoren für die Proteasen gewährleisten, synthetisiert und getestet werden,
- b) über verzweigte Moleküle, durch ausreichend lange Spacer direkt an den Synthesekern des kontinuierlichen Trägers, oder linear in der Sequenz verbunden ein Substrat mit einem intern gequenchten Fluoreszenz-Donor-Akzeptor-Paar zur Verfolgung der Proteaseaktivität in räumlicher Nähe zum zu testenden Inhibitor besitzen.

Umfassend die folgenden Schritte:

- Herstellen des Proteasesubstrates zur Verfolgung der inhibitorischen Aktivität,
- wobei die Substratsequenz von einem Fluoreszenz Donor-Akzeptor-Paar eingerahmt wird,
- Herstellen der zu untersuchenden Inhibitoren an verzweigten Molekülen, die das Proteasesubstrat tragen, an ausreichend langen Spacern direkt an den Syntheseankern des kontinuierlichen Trägers, oder linear mit der Substratsequenz verbunden,
- Zugeben einer Lösung, die Proteaseaktivität enthält, und Abwarten einer Reaktionszeit,
- Abwaschen der Proteaselösung und der abgespaltenen Substratfragmente,
- Messung der Zunahme der Fluoreszenz und
- Identifizieren der Inhibitorsequenzen durch Bestimmung des Ortes auf dem kontinuierlichen Träger.

Proteaseinhibitoren müssen notwendigerweise an die Protease binden, und zwar entweder am aktiven Zentrum, was eine Inhibition durch Kompetition mit dem Substrat bewirkt, oder an einer anderen Stelle des Proteins, was eine nichtkompetitive Änderung der dreidimensionalen Protease-Struktur durch die Binding des Inhibitors erfordert.

(II) Deshalb kann die Aufgabe auch durch ein Verfahren zur Herstellung und Identifizierung von Inhibitoren gelöst werden, die auf polymeren kontinuierlichen Oberflächen anders als Cellulose (z. B. mikroporöse Polypropylen Membranen modifiziert durch photoinitierte Graft-Kopolymerisation mit Poly-Ethylenglykol Methacrylsäure), die eine Zugänglichkeit eines hohen Prozentsatzes der Inhibitoren für die Proteasen gewährleisten, synthetisiert und auf Bindung getestet werden.

Umfassend die folgenden Schritte:

- Herstellen der zu untersuchenden Inhibitoren auf polymeren kontinuierlichen Oberflächen anders als Cellulose (z. B. mikroporöse Polypropylen Membranen modifiziert durch photoinitierte Graft-Kopolymerisation mit Poly-Ethylenglykol Methacrylsäure)
- Zugeben einer Lösung, die Proteaseaktivität enthält, und Abwarten einer Inkubationszeit,
- Abwaschen der Proteaselösung und der möglicherweise abgespaltenen Molekülfragmente,
- Detektion der Bindung von Proteasen an mögliche Inhibitorsequenzen durch (a) immunologische Nachweise mit spezifischen Antikörpern, die ein Reportereozym tragen oder durch sekundäre reporterenzymgekoppelte Antikörper nachgewiesen werden können, (b) geeignete Fluoreszenz- oder Enzymmarkierungen an den Proteasen, (c) radioaktive Markierungen, (d) durch Elektrottransfer oder durch Transfer mit anderen Methoden der Enzyme auf kontinuierliche Oberflächen, die komplett mit mindestens einer geeigneten Substratsequenz deren Spaltung nachgewiesen werden kann belegt sind oder (e) den Transfer auf einen anderen Träger und Nachweis der Proteasen durch die Verfahren (a) bis (c),
- Identifizieren der Inhibitorsequenzen durch Bestimmung des Ortes auf dem kontinuierlichen Träger.
- Untersuchung, der proteasebindenden Sequenzen auf inhibitorische

Wirkung in geeigneten Testsystemen.

Vorteile

Die Vorteile der unter (I) und (II) beschriebenen Lösungen gegenüber den bekannten Verfahren sind die gleichen

wie für den Assay zur Identifizierung der Proteasesubstrate.

Die Lösung (I) hat gegenüber Lösung (II) den Vorteil, daß direkt auf inhibitorische Wirkung getestet wird. Allerdings sind entsprechende Bibliotheken nicht wiederverwendbar, da die Substratsequenzen, sofern keine inhibitorische Wirkung vorhanden ist, gespalten werden. Lösung (II) hat gegenüber Lösung (I) den Vorteil, daß die Bibliotheken wiederverwendbar sind. Allerdings muß nach der Identifizierung proteasebindender Sequenzen nachgewiesen werden, ob durch die Bindung auch Inhibition hervorgerufen wird.

Anwendungen

Proteaseinhibitoren, die mit den oben beschriebenen Verfahren identifiziert werden können, haben eine breite Anwendung in der Grundlagenforschung, der Biotechnologie, der Lebensmittelchemie und der Pharmazie.

- Mit Proteasen verunreinigte biologische Proben werden durch Proteaseinhibitoren stabilisiert.
- Proteaseverunreinigungen und im Produktionsprozeß zugesetzte Proteasen müssen bei biotechnologischen Herstellungsprozessen häufig wieder inaktiviert werden. Bei Produkten, bei denen sich wegen der Stabilität der anderen Bestandteile eine Hitzeinaktivierung verbietet, werden Proteaseinhibitoren verwendet.
- Im Bereich der Lebensmittelchemie dienen Proteaseinhibitoren zur Haltbarmachung von frischen Naturprodukten.
- Waschmittel enthalten Proteasen, die im Konzentrat durch Inhibitoren gehemmt sind.
- Da viele endogene Proteasen in pathologischen Zuständen involviert sind, werden Proteaseinhibitoren als Pharmaka eingesetzt. Ein großes Anwendungsfeld ist z. B. die Tumorthherapie, da endogene Proteasen die Zersetzung des Bindegewebes zur Tumordinvasion in angrenzendes Gewebe bewirken.

Ausführungsformen

Enzyme

Enzyme können Proteasen und Peptidasen sein. Werden als Substrate Oligoester verwendet, kann die Aktivität von Esterasen untersucht werden. Werden als Substrate Oligosaccharide verwendet, kann die Aktivität von zuckerabbauenden Enzymen (z. B. Cellulasen) untersucht werden.

Substrate und Inhibitoren

Substanzen, die auf ihre Eigenschaften als Substrate oder Inhibitoren getestet werden sollen, können alle in der Festphasenchemie synthetisierbaren Verbindungen sein. Die Festphasensynthese ist ausführlich beschrieben in [Solid-Phase synthesis, E. ATHERTON and R. C. SHEPPARD (1989) IRL Press, ISBN 1-85221-133-4 und Amino Acid and Peptide Syntheses, J. JONES, Oxford Science Publication (1992) ISBN 0-19-855668-3]. Bevorzugt sind Peptide (D-, L- und unnatürliche Aminosäuren [Houben-Weyl (1974) Georg Thieme Verlag, 4. Auflage und Katalog der Firma Bachem, Bubendorf, Schweiz]), Substanzen mit amidisch verknüpften Bausteinen, Oligoester oder Peptide mit einzelnen Esterbindungen, Peptioide, Hydantoine, Benzodiazipine Oligoharnstoffe, Oligothioharnstoffe, Oligocarbamate, Oligothiocarbamate, Oligosaccharide, Pyrrolidone, Benzisothiazolone, PNAs, Cyanurchloride [Combinatorial Chemistry, Synthesis and Application, S. R. WILSON and A. W. CZARNIK (1997) John Wiley & Sons, Inc., ISBN

0-471-12687-X und Annual. Reports in Combinatorial Chemistry and Molecular Diversity Vol. 1, W. H. MOOS, M. R. Pavia, A. D. Ellington and B. K. Kay (1997) Escom, ISBN 90-72199-23-5]. Alle synthetisch realisierbaren Mischformen der genannten Bausteine sind anwendbar.

Vorteilhaft kann sein, wenn die Substratmoleküle mindestens einen weiteren Rahmenbaustein außerhalb des N-/C-terminalen Fluoreszenz-Donor-Akzeptor-Paares aufweisen, wobei die um die Rahmenbausteine erweiterten Substratmoleküle im wesentlichen die Funktion aufweisen, die die Substratmoleküle ohne Rahmenbausteine besitzen. Der Ausdruck Rahmenbaustein ist analog zu den Verbindungen im vorigen Absatz zu verstehen.

Kontinuierliche feste Träger

Mikroporösen Polypropylenmembranen (Porengröße 150 µm), die durch photoinitierte Graft-Kopolymerisation mit Poly-Ethylenglykol Methacrylsäure modifiziert wurden sind für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeignet. Poly-Ethylenglykole aus 2 bis 60 Einheiten oder andere Spacer sind für das Verfahren anwendbar.

Fluoreszenz-Donor-Akzeptor Paare

Alle Fluoreszenz-Donor-Akzeptor Paare sind prinzipiell für das erfindungsgemäße Verfahren geeignet. Beispielhaft sind die folgenden Paare genannt: (1) Abz/Dnp (2-Aminobenzoyl/2,4-dinitrophenyl [JULIANO et al. (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol. 173, pp 647-652], (2) Edans/Dabcyl (5-(2-Aminoethyl)aminonaphthalen Sulfonsäure/4-(4'-Dimethylaminobenzenazo)benzoesäure [WANG and KRAFFT (1992 Bioorg. Biomed. Chem. Lett., Vol. 2, pp 1665-1668], (3) Abz/Tyr(NO₂) (2-Aminobenzoyl/3-Nitrotyrosin) [MELDAL and BREDDAM (1991) Anal. Biochem., Vol. 195, pp 141-147].

Beispiel

Gegeben waren eine Peptidsequenz, von der bekannt war, daß sie durch die Protease Trypsin gespalten wird (PALLKEAPRAEEELP) und eine Sequenz, die nicht von Trypsin gespalten wird (GGGGGGG). Diese Peptide wurden mit dem Fluoreszenzdonor N-Methyl-Anthranilsäure am C-Terminus und dem Fluoreszenzakzeptor 3-Nitrotyrosin am N-Terminus auf einer mikroporösen Polypropylen Membran, die durch photoinitierte Graft-Kopolymerisation mit Poly-Ethylenglykol Methacrylsäure modifiziert wurde, synthetisiert. Als Vergleich wurden die gleichen Sequenzen auf Cellulose (Whatman 50 Filterpapier, Maidstone, Großbritannien) synthetisiert. Das Peptidsyntheseverfahren ist beschrieben in [KRAMER and SCHNEIDER-MERGENER (1998) Meth. Mol. Biol., Vol. 87, pp 25-39].

Beide Membranen wurden identisch behandelt:

- 3 min Waschen mit Methanol
- 3 mal 10 min Waschen mit PBS-Puffer pH 7.5 (PBS = Phosphate Buffered Saline)
- Inkubation mit 100 µg/ml Trypsin für 2 h
- 3 mal 10 min Waschen mit PBS-Puffer pH 7.5
- Messung der Fluoreszenz mit dem Lumi-Imager von Boehringer Mannheim



Oberer Spot: Y*-GGGGGGG-K*---Cellulose

Relative Intensität: 202427

Unterer Spot: Y*-PALLKEAPRAEEELP-K*---Cellulose

Relative Intensität: 391455

Intensitätssteigerung bei Spaltung um den Faktor 1.9



Oberer Spot: Y*-GGGGGGG-K*--- Polypropylen (modifiziert)

Relative Intensität: 20698

Unterer Spot: Y*-PALLKEAPRAEEELP-K*--- Polypropylen (modifiziert)

Relative Intensität: 497816

Intensitätssteigerung bei Spaltung um den Faktor 24

Die spaltbare Sequenz wurde auf der modifizierten Polypropylenmembran und auf der Cellulosemembran gespalten. Die Sequenz GGGGGGG wurde dagegen nicht gespalten. Die Zugänglichkeit der Substratsequenz PALLKEAPRAEEELP ist auf der modifizierten Polypropylenmembran wesentlich besser als auf der Cellulose. Bei der Spaltung wird eine Steigerung der Intensität um den Faktor 24 auf der modifizierten Polypropylenmembran im Vergleich zum Faktor 1.9 auf der Cellulosemembran beobachtet.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren von mindestens einer Protease-Aktivität, die auf mindestens ein Substrat einwirkt oder einwirken,

- a) welches Substrat eine definierte Aminosäure-Sequenz aus natürlichen oder nicht-natürlichen Aminosäuren oder ein Molekül aus anderen polymeren Bausteinen umfaßt,
- b) welches Substrat mit einem Träger verbunden ist, der ein nicht mikrobiologisch abbaubares Polymer ist,
- c) welches Substrat einem definierten Reaktionsort auf dem Träger zuzuordnen ist und homogen ist oder aus einem Gemisch bekannter Zusammensetzung besteht,
- d) welches Substrat ein Fluoreszenz-Donor-Akzeptor-Paar aufweist, wobei der Fluoreszenz-Donor proximal zum Träger und der Fluoreszenz-Akzeptor distal zum Träger an dem Substrat angeordnet ist, und Donor und Akzeptor durch die versuchsweise zu spaltenden Sequenz des Substrats miteinander verbunden sind,

umfassend die folgenden Schritte:

- Inkubation des oder der Substrate mit der Protease
- Abwaschen der Protease
- Detektion der Fluoreszenz des Donors, und

- Zuordnung der Reaktionsorte und der Fluoreszenz-Aktivität.
- 2. Verfahren zum Identifizieren von mindestens einem Protease-Inhibitor, der oder die auf mindestens eine Protease einwirkt oder einwirken,
 - a) welcher Inhibitor eine definierte Aminosäure-Sequenz aus natürlichen oder nicht-natürlichen Aminosäuren oder ein Molekül aus anderen polymeren Bausteinen umfaßt,
 - b) welcher Inhibitor über verzweigte Moleküle, durch ausreichend lange Spacer direkt an den Synthesankern des kontinuierlichen Trägers, oder linear in der Sequenz verbunden ein Substrat mit einem intern gequenchten Fluoreszenz-Donor-Akzeptor-Paar zur Verfolgung der Proteaseaktivität in räumlicher Nähe zum zu testenden Inhibitor besitzt und mit einem Träger verbunden ist, der ein nicht mikrobiologisch abbaubares Polymer ist,
 - c) welcher Inhibitor einem definierten Reaktionsort auf dem Träger zuzuordnen ist und homogen ist oder aus einem Gemisch bekannter Zusammensetzung besteht,
 Umfassend die folgenden Schritte:
 - Herstellen des Proteasesubstrates zur Verfolgung der inhibitorischen Aktivität,
 - wobei die Substratsequenz von einem Fluoreszenz-Donor-Akzeptor-Paar eingerahmt wird,
 - Herstellen der zu untersuchenden Inhibitoren an verzweigten Molekülen, die das Proteasesubstrat tragen, an ausreichend langen Spacern direkt an den Synthesankern des kontinuierlichen Trägers oder linear mit der Substratsequenz verbunden,
 - Zugabe einer Lösung, die Proteaseaktivität enthält, und Abwarten einer Reaktionszeit,
 - Abwaschen der Proteaselösung und der abgespaltenen Peptidfragmente,
 - Messung der Zunahme der Fluoreszenz und
 - Zuordnung der Reaktionsorte und der Inhibitor-Aktivität.
- 3. Verfahren zum Identifizieren von mindestens einem Protease-Inhibitor, der oder die auf mindestens eine Protease einwirkt oder einwirken,
 - a) welcher Inhibitor eine definierte Aminosäure-Sequenz aus natürlichen oder nicht-natürlichen Aminosäuren oder ein Molekül aus anderen polymeren Bausteinen umfaßt,
 - b) welcher Inhibitor mit einem Träger verbunden ist, der ein nicht mikrobiologisch abbaubares Polymer ist,
 - c) welcher Inhibitor einem definierten Reaktionsort auf dem Träger zuzuordnen ist und homogen ist oder aus einem Gemisch bekannter Zusammensetzung besteht,
 Umfassend die folgenden Schritte:
 - Herstellen der zu untersuchenden Inhibitoren auf der polymeren kontinuierlichen Oberfläche
 - Zugabe einer Lösung, die Proteaseaktivität enthält, und Abwarten einer Inkubationszeit,
 - Abwaschen der Proteaselösung und der möglicherweise abgespaltenen Molekülfragmente,
 - Detektion der Bindung von Proteasen an möglichen Inhibitorsequenzen durch (a) immunologische Nachweise mit spezifischen Antikörpern, die ein Repoterenzym tragen oder durch sekundäre reporterenzymgekoppelte Antikörper nachgewiesen werden können, (b) geeignete Fluoreszenz- oder Enzymmarkierungen an den Proteasen,

- (c) radioaktive Markierungen, (d) durch Elektrottransfer oder durch Transfer mit anderen Methoden der Enzyme auf kontinuierliche Oberflächen, die komplett mit mindestens einer geeigneten Substratsequenz deren Spaltung nachgewiesen werden kann belegt sind oder (e) durch Transfer auf einen anderen Träger und Nachweis durch die Methoden (a) bis (c),
- Identifizieren der Inhibitorsequenzen durch Bestimmung des Ortes auf dem kontinuierlichen Träger.
- Untersuchung, der proteasebindenden Sequenzen auf inhibitorische Wirkung in geeigneten Testsystemen.
- 4. Verfahren nach einem der vorigen Ansprüche, bei dem Proteasen in Mischungen, Suspensionen, Emulsionen, Körperflüssigkeiten, Zellsuspensionen oder in vivo verwendet werden.
- 5. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei das Polymer des Trägers ein Polyalkan, ein Polyvinylchlorid oder ein mit Fluor ganz oder teilweise substituiertes Polyalkan oder ein Gemisch aus einem der vorherigen Polymeren ist.
- 6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Polyalkan ein Polyethylen oder ein Polypropylen ist.
- 7. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei der Träger mit Graft-Kopolymerisation mit Polyethylenglykol Methacrylsäure modifiziert ist.
- 8. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei zwischen Träger und Substrat Abstandhalter (Spacer) angeordnet sind.
- 9. Test-Kit zum Identifizieren von Protease-Aktivität, die auf mindestens ein Substrat einwirkt,
 - a) welches Substrat eine definierte Aminosäure-Sequenz aus natürlichen oder nicht-natürlichen Aminosäuren oder ein Molekül aus anderen polymeren Bausteinen umfaßt,
 - b) welches Substrat mit einem Träger verbunden ist, der ein nicht mikrobiologisch abbaubares Polymer ist,
 - c) welches Substrat einem definierten Reaktionsort auf dem Träger zuzuordnen ist und homogen ist oder aus einem Gemisch bekannter Zusammensetzung besteht,
 - d) welches Substrat ein Fluoreszenz-Donor-Akzeptor-Paar aufweist, wobei der Fluoreszenz-Donor proximal zum Träger und der Fluoreszenz-Akzeptor distal zum Träger an dem Substrat angeordnet ist, und Donor und Akzeptor durch die versuchsweise zu spaltenden Sequenz des Substrats miteinander verbunden sind,
 umfassend:
 - einen Träger mit gegebenenfalls über einen Abstandhalter (Spacer) gekoppeltem Substrat an definierten Reaktionsorten.
- 10. Test Kit nach Anspruch 9, wobei zusätzlich
 - mindestens eine Protease und/oder
 - mindestens ein Protease-Inhibitor nach Maßgabe der in den Ansprüchen 2 und 3 beanspruchten Verfahren vorhanden ist.
- 11. Test Kit nach den Ansprüchen 9 oder 10, wobei ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8 verwendet wird.
- 12. Verfahren oder Test-Kits nach den vorherigen Ansprüchen in denen statt einer Protease mindestens eine Esterase oder ein zuckerabbauendes Enzym verwendet wird.